



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : G01N 33/569	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/40970 (43) Date de publication internationale: 13 juillet 2000 (13.07.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/03311</p> <p>(22) Date de dépôt international: 29 décembre 1999 (29.12.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/16727 31 décembre 1998 (31.12.98) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1, rue du Professeur Calmette, Boîte postale 245, F-59019 Lille Cedex (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). GRAS-MASSE, Hélène [FR/FR]; 321, rue de la Rosière, F-59710 Merignies (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TRANCHAND-BUNEL, Denis [FR/FR]; 2, rue Jacques Brel, F-59790 Ronchin (FR). AURIAULT, Claude [FR/FR]; 60, rue Louis Guislain, F-59310 Nomain (FR).</p> <p>(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>

(54) Title: DETECTING AND MONITORING HIV VIRAL INFECTIONS

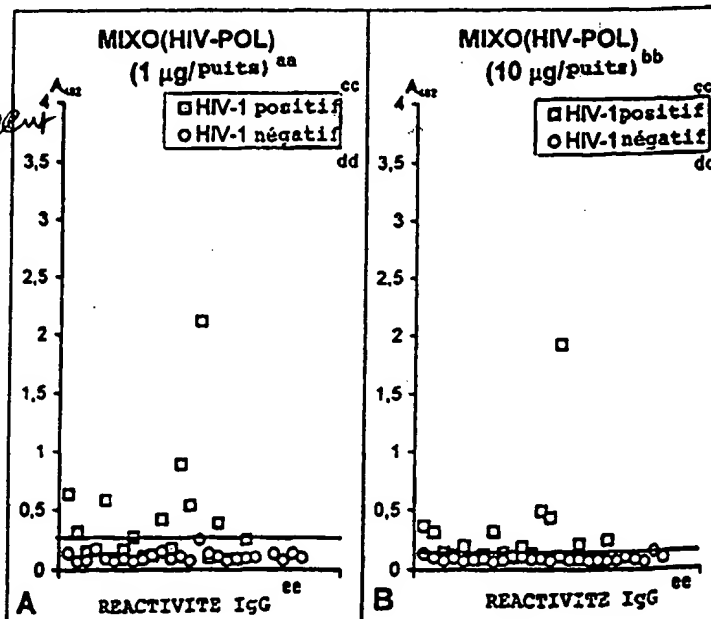
(54) Titre: DETECTION ET SUIVI DES INFECTIONS VIRALES A VIH

(57) Abstract

The invention concerns a reagent for detecting and monitoring viral infections, caused by the human immunodeficiency virus (HIV) and its uses for detecting human immunodeficiency. Said reagent comprises a mixture consisting of (1) an antigenic peptide coded by the HIV pol gene comprising 60 amino acids, preferably between 20 and 40 amino acids; and (2) a mixture (called mixotope) of convergent combinatorial peptides, derived from said antigenic peptide.

(57) Abrégé

Réactif de détection et de suivi des infections virales, provoquées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et ses applications pour la détection de l'immunodéficience humaine. Ladite réaction comprend un mélange constitué par (1) un peptide antigénique codé par le gène pol du VIH1 comprenant au plus 60 acides aminés, de préférence entre 20 et 40 acides aminés et (2) un mélange (dénommé mixotope) de peptides combinatoires convergents, dérivés dudit peptide antigénique.



aa... (1 µg/MICROWELL)
bb... (10 µg/MICROWELL)
cc... HIV-1 POSITIVE
dd... HIV-1 NEGATIVE
ee... IgG REACTIVITY

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovenie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Belarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroon		démocratique de Corée				
CN	Chine	KR	République de Corée				
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan				
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie				
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein				
DK	Danemark	LK	Sri Lanka				
EE	Estonie	LR	Libéria				

DETECTION ET SUIVI DES INFECTIONS VIRALES A VIH

La présente invention est relative à un réactif de détection et de suivi des infections virales, provoquées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et à ses applications pour la détection de l'immunodéficience humaine.

Les premiers essais de dépistage de l'infection à VIH, mis en place en 1983 et 1985, utilisaient un lysat viral pour capturer les anticorps anti-VIH. Ces tests présentaient l'inconvénient majeur de manquer à la fois de sensibilité et de spécificité. En outre, du fait de l'utilisation d'un lysat viral, il existait une difficulté de reproduction des antigènes viraux de lot à lot et la nécessité d'effectuer des cultures de virus en grande quantité, ce qui présentait un danger pour le manipulateur.

La connaissance de la séquence complète du virus VIH1 (S. Wain-Hobson et al., Cell, 1985, 40, 9-17) a ouvert la voie à de nouvelles approches pour la production d'antigènes.

Ainsi les brevets européens EP 181 150 et EP 387 914 décrivent l'utilisation du génie génétique, pour l'obtention de polypeptides (antigènes), en vue de détecter les anticorps anti-VIH1.

Ces avancées ont permis le développement du sérodiagnostic (détection des immunoglobulines dans le sérum) du VIH. Les anticorps anti-VIH1 produits sont ainsi détectés par réaction avec un ou plusieurs antigènes qui réagissent plus ou moins spécifiquement avec lesdits anticorps.

Toutefois, les immunoessais mettant en œuvre de tels réactifs présentent de manière générale une faible sensibilité, notamment lorsqu'il existe une faible affinité entre l'anticorps à tester et l'antigène sélectionné. Ceci est notamment le cas lors d'une séroconversion récente et/ou lors de l'apparition d'un nouveau sous-type de VIH.

En effet, un tel immunoessai doit être sensible, fiable, spécifique, simple et rapide ; toutefois, la sensibilité de ces tests est essentiellement fonction du choix de l'antigène ou réactif. C'est la raison pour laquelle de nombreuses recherches ont été effectuées pour mettre au point des antigènes plus sensibles et plus spécifiques.

Pour résoudre en particulier le problème du manque de sensibilité, certains Auteurs, ont proposés d'utiliser, en combinaison, différents antigènes.

Les différentes voies d'approche qui ont été utilisées sont les suivantes :

- 5 - utilisation d'un ou plusieurs peptides de synthèse, de différentes régions codantes du VIH (J. Wang et al., PNAS, 1986, 83, 6159-6163) ; la Demande EP 220 273, par exemple, décrit une série de peptides de 6 à 49 acides aminés, et notamment un peptide contenant l'épitope immunodominant de la glycoprotéine transmembranaire gp41 (peptide 39) ;
- 10 - utilisation d'antigènes peptidiques marqués provenant d'un domaine du VIH (Brevet US 5 221 610) ;
- utilisation de peptides biotinylés issus de la gp41, de la boucle V3 ou de la gp120 : WO 93/18054 ; EP 307 149.

Les travaux sur les peptides de synthèse (J. Wang et al., PNAS, 15 1986, 83, 6159-6163 et Demande EP 220 273, par exemple) ont démontré l'intérêt d'utiliser des peptides de synthèse et leur mélange, pour la détection d'anticorps anti-VIH, en vue d'améliorer la qualité des dosages immunologiques, à la place des protéines recombinantes ou du virus complet (lysat viral).

Les tests fondés sur l'utilisation desdits peptides ont entraîné de 20 meilleures performances en terme de sensibilité, spécificité et reproductibilité, avec un prix de revient des réactifs diminué et l'absence de tout danger de contamination, lié à la mise en culture du virus. Ces travaux ont ensuite été suivis par de nombreuses équipes (Demande EP 0 278 148, Demande EP 0 214 709).

Toutefois, ces peptides de synthèse et leur mélange ne permettent 25 toujours pas d'éviter les faux-négatifs (sensibilité insuffisante).

Dans le but d'atteindre une sensibilité suffisante pour pouvoir détecter les séroconversions récentes ainsi que les nouveaux sous-types de VIH, il a été proposé (Demande EP 0 857 731) d'utiliser, comme réactif :

- * des mélanges de peptides, obtenus à partir d'une séquence 30 comprenant un domaine épitopique variable issu de la gp41, ou de la gp120 ; lesdits peptides présentent une longueur de 6 à 50 acides aminés, constituent des variantes

dudit domaine épitopique (homologies de séquence d'au moins 30 % avec le domaine épitopique natif ou une séquence consensus) et contiennent en des positions sélectivement choisies :

- au moins un groupe de marquage, d'activation ou de liaison à une phase solide et/ou
- un ou plusieurs acides aminés sélectionnés à partir d'un mélange d'acides aminés sélectionnés à partir de variants connus dudit domaine épitopique ou sélectionnés arbitrairement.
- * des compositions antigéniques multimériques présentant la formule générale $P^1\{P^2[P^3(P^4)]_s\}_r$, dans laquelle P^1 , P^2 , P^3 et P^4 représentent des mélanges peptidiques tels que définis ci-dessus, $r = 1$ ou 2 , $s = 0$ à 4 et $t = 0$ à 8 , ou
- * des compositions polyhapténiques de formule générale : $(P)_nT(-L)_m$ ou $T(-P-L_m)_n$, dans laquelle T représente un support, P représente les peptides du mélange de peptides, tel que défini ci-dessus, L représente des groupes de marquage ou de liaison à une phase solide, n est un nombre entier compris entre 2 et 100 et m est un nombre entier compris entre 1 et 10 .

Ces différentes compositions ou mélanges contiennent généralement entre 2 et 2000 et jusqu'à 10^{10} peptides qui comprennent des séquences peptidiques individuelles différentes qui se retrouvent le plus près possible d'une distribution statistique prédéfinie ; ils peuvent être utilisés comme réactifs immunologiques.

Toutefois, même si ces mélanges permettent d'obtenir une meilleure sensibilité, ils ne permettent notamment pas de résoudre effectivement le problème de la détection fiable de nouveaux sous-types de virus et de virus mutés. Or, le virus VIH1 est sujet à de fréquentes mutations ; dans ce contexte, certains de ces virus sont peu ou pas détectés par ces tests en raison même des mutations qu'ils portent, ce qui a pour conséquence, la non-détection des sujets contaminés par ces virus (faux négatifs).

C'est pourquoi la Demanderesse s'est donné pour but de pourvoir à un nouveau réactif de détection des infections à VIH, apte à être utilisé dans les tests immunoenzymatiques, qui soit à la fois spécifique et sensible et qui permette d'obtenir un gain de sensibilité d'au moins 15 à 30 % par rapport aux réactifs de l'art antérieur.

Un tel réactif répond mieux aux besoins de la pratique que les réactifs de l'Art antérieur, dans le cadre des tests immunoenzymatiques, notamment de type ELISA.

Ce nouveau réactif permet notamment de résoudre effectivement le problème de la détection de nouveaux sous-types de virus et de virus mutés.

5 La présente invention a pour objet un réactif de détection d'une infection provoquée par un virus de l'immunodéficience humaine, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange constitué par (1) un fragment ou peptide antigénique codé par le gène *pol* du VIH1 comprenant au plus 60 acides aminés, de préférence entre 20 et 40 acides aminés et (2) un mélange (dénommé mixotope) de peptides combinatoires
10 convergents, dérivés dudit fragment antigénique.

Au sens de la présente invention, on entend par mélange de (1) et de (2) soit l'association de (1) et (2) dans ledit mélange, soit l'association séquentielle de (1) et (2) sur un support solide.

Au sens de l'invention, on entend par mixotope, le mélange de tous
15 les peptides combinatoires, obtenus à partir du fragment antigénique sélectionné, par dégénération artificielle ou construite ; ils sont, de préférence, obtenus au cours d'une synthèse unique et représentent l'antigène peptidique et sa variabilité, dans sa fonction de reconnaissance d'une population d'anticorps ; différents mixotopes peuvent être obtenus à partir du même peptide ; les facteurs qui interviennent dans la constitution
20 d'un mixotope sont :

- d'une part, le pourcentage de dégénération du peptide antigénique natif sélectionné (dégénération totale ou partielle) ; et

- d'autre part, le mode de sélection de la substitution des acides aminés dudit peptide antigénique natif ; pour chaque position de la séquence du peptide
25 antigénique natif choisi, la substitution en acides aminés est sélectionnée sur la base de la matrice de remplacement, établie par H.M. GEYSEN et al. (*J. Mol. Recog.*, 1988, 1, 32-41), ou modifiée, comme illustrée à la figure 1, en tenant compte de la tolérance de la reconnaissance d'anticorps, en fonction de la substitution en acides aminés dans les épitopes linéaires : on choisit de préférence, pour une position donnée, les acides
30 aminés présentant le pourcentage de " remplaçabilité " le plus élevé. Toutefois, il est

préférable de prendre en compte la conformation des épitopes naturels, avant dégénération.

Le mixotope au sens de la présente invention, constitué de peptides combinatoires convergents, dérivés d'un peptide antigénique natif, représente donc
5 une dégénérescence artificielle et non naturelle de la structure native par le remplacement systématique ou partiel de chaque acide aminé par un autre issu de la matrice de remplaçabilité de GEYSEN ou de la matrice selon la figure 1.

Ledit mixotope qui peut être également dénommé convertope, diffère des mixotopes décrits dans H. GRAS-MASSE et al. (*Peptide Research*, 1992,
10 5, 4, 211-216), qui sont des peptides divergents obtenus par dégénérescence naturelle en tenant compte des variations antigéniques naturelles ou observées fréquemment aux cours de l'évolution et à visée vaccinale.

Également au sens de l'invention, on entend par matrice de remplaçabilité construite, une matrice qui ne reproduit par les variations naturelles ou obser-
15 vées fréquemment dans l'évolution ; la matrice de remplaçabilité de GEYSEN ou la matrice selon la figure 1, sont particulièrement adaptées.

De manière surprenante, les réactifs selon l'invention permettent d'obtenir des résultats fiables, reproductibles, très sensibles et très spécifiques, dans la mesure où les combinaisons selon l'invention présentent un effet de synergie dans la
20 détection des anticorps induits par les virus ; en particulier, on obtient un gain de sensibilité de 15 à 30 %.

Selon un mode de réalisation avantageux du réactif selon l'invention, ledit peptide antigénique correspond à un épitope de l'intégrase codée par le gène *pol* du VIH1, et correspond de préférence à la séquence
25 KIQNFRVYYRDSRDPLWKGPALLWKGEAVVIQDN (SEQ ID NO:1) (HIV-POL) ; il a l'avantage de ne posséder que peu de permutations naturelles au sein des groupes M et O et des sous-types de la classe M.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit peptide antigénique sélectionné (HIV-POL) a été dégénéré de façon rigoureuse sur la
30 base de la matrice de remplacement établie par GEYSEN et al., précité ou modifiée comme illustré à la figure 1, qui permet l'obtention de plus de 10^{10} peptides.

De manière inattendue, la combinaison d'un épitope de l'intégrase (fragment immunodominant, de préférence) avec un mixotope, dérivé dudit épitope, améliore, de manière significative, la sensibilité et la spécificité du sérodiagnostic immunoenzymatique du VIH1 ; en effet, un tel réactif va permettre de capter des anticorps de faible affinité pour la séquence native. La combinaison peptide natif avec le mixotope nommé MIXO(HIV-POL) permet d'augmenter la réactivité du mélange d'antigènes vis-à-vis des anticorps naturellement produit vis-à-vis de la structure mère (haute et basse affinité pour celle-ci).

En particulier, la combinaison de HIV-POL avec son mixotope, MIXO(HIV-POL), permet d'augmenter la sensibilité de la sérodétection d'au moins 15 % tout en présentant une spécificité de 100 %.

Le mélange de peptides dégénérés, artificiellement produit, au cours d'une même synthèse est combiné avec le peptide natif. Une telle combinaison permet, de manière inattendue, d'augmenter la réactivité du mélange d'antigènes produit vis-à-vis des anticorps naturellement induits par le virus.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du réactif selon l'invention, le peptide antigénique (1) et le mixotope (2) sont fixés sur un support solide, de préférence des plaques de microtitration.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit peptide (1) et ledit mixotope (2) sont fixés séquentiellement sur ledit support.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du réactif selon l'invention, le rapport fragment antigénique:mixotope dans le mélange est compris entre 1:10 et 1:100.

La présente invention a également pour objet un procédé de diagnostic d'une infection à VIH1, par une méthode immuno-enzymatique, caractérisé en ce qu'il met en œuvre un réactif selon l'invention.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, il comprend :

- la mise en contact d'un sérum à analyser avec un réactif tel que défini ci-dessus,
- l'addition d'anticorps anti-Ig humaines, couplés à une enzyme et

- la révélation qualitative et/ou quantitative des anticorps anti-intégrase, éventuellement présents dans le sérum à analyser par addition du substrat de l'enzyme.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, il comprend :

- la fixation d'un réactif selon l'invention sur un support, tel qu'une plaque de microtitration,
- l'addition du sérum à analyser et
- la détection de la fixation des anticorps anti-intégrase présents dans ledit sérum par addition d'anticorps anti-IgG humaines, couplés à une enzyme et
- la révélation qualitative et/ou quantitative au spectrophotomètre par addition du substrat de l'enzyme.

La présente invention a, en outre, pour objet un kit ou coffret de diagnostic d'une infection virale à VIH, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif selon l'invention.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre une matrice de remplacement des acides aminés, modifiée par rapport à celle de H.M. GEYSEN (référence précitée) ; on obtient le mixotope MIXO(HIV-POL), forme dégénérée par remplacement systématique de chaque acide aminé par son homologue pris dans la matrice de remplaçabilité de GEYSEN.
- la figure 2 illustre la composition en acides aminés du peptide HIV1-POL, déterminée 24 h après une hydrolyse acide totale (HAT) (histogrammes noirs), comparée à la composition théorique, calculée sur la base d'une quantité équimoléculaire de chaque acide aminé, introduit dans les positions dégénérées (histogrammes blancs). Le code une lettre est utilisé pour les acides aminés. B représente Asn ou Asp, Z représente Glu et Gln.

- la figure 3 représente la composition en acides aminés du mixotope-MIXO(HIV-POL), déterminée 24 h après une hydrolyse acide totale (HAT) (histogrammes noirs), comparée à la composition théorique, calculée sur la base d'une quantité équimoléculaire de chaque acide aminé, introduit dans les positions dégénérées (histogrammes blancs). Le code une lettre est utilisé pour les acides aminés. B représente Asn ou Asp, Z représente Glu et Gln.

- la figure 4 illustre la réactivité IgG de 20 sérums HIV1 séropositifs (•) et de 26 sérums HIV1 séronégatifs (○), caractérisés par immunofluorescence avec le peptide HIV-POL fixé sur un support solide à raison de 0,1 µg/puits (figure 4A) ou à raison de 1 µg/puits (figure 4B). La ligne horizontale représente la valeur seuil, correspondant à la moyenne obtenue avec les sérums séronégatifs + 3 déviations standards (SD). Ces figures comportent en abscisse le nombre de sérums et en ordonnée l'absorbance à 492 nm, avec un test ELISA mettant en œuvre la séquence HIV-POL (SEQ ID NO:1).

- la figure 5 représente l'effet du mixotope MIXO(HIV-POL) sur la réactivité des IgG des sérums HIV1 séropositifs (•) et des sérums séronégatifs (○) à deux concentrations différentes : 1 µg/puits (figure 5A) ou à 10 µg/puits (figure 5B), dans un test ELISA. La ligne horizontale représente la valeur seuil correspondant à la moyenne des sérums contrôles + 3 SD. Ces différentes figures comprennent en abscisse le nombre de sérums et en ordonnée l'absorbance à 492 nm.

- la figure 6 illustre l'effet de l'association peptide HIV-POL + mixotope MIXO(HIV-POL) sur la réactivité IgG des sérums séropositifs (•) et séronégatifs (○) dans des tests ELISA. Chaque puits de plaque de microtitration est séquentiellement revêtu de 1 µg de peptide HIV-POL, puis de 10 µg de mixotope MIXO(HIV-POL) et mis en contact avec les sérums.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Préparation des réactifs selon l'invention.a) Synthèse du peptide :

Le peptide natif HIV-POL (SEQ ID NO:1) est synthétisé en phase solide en utilisant la stratégie conventionnelle du type Boc-benzyle (ou Fmoc), dans un synthétiseur de peptides automatisé (modèle 430A, Applied Biosystems Inc.). Les groupes de protection des chaînes latérales sont les suivants : Asn (Trt), Gln (Trt), Asp (OChx), Glu (OChx), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Arg (Tos), Cys (4-MeBzl), et His (Dnp) (voir R.C. SHEPPARD, *Peptide, Synthesis, Comp. Org. Chem.*, 1979, 5, 321-363).

Les acides aminés sont introduits en utilisant le protocole d'activation HBTU/HOBt avec un double couplage systématique sur une résine Boc-Gln-Pam (Applied Biosystems). Après thiolyse du groupe dinitrophényl Dnp, suivie par une déprotection finale et un clivage à l'acide fluorhydrique, le peptide clivé et déprotégé est précipité et lavé avec du diéthyléther froid, puis dissous dans de l'acide acétique à 5 % et lyophilisé.

Le peptide est purifié à plus de 90 % sur une colonne de 5 mm x 250 mm, 100 Å Nucleosil C18 RP-HPLC préparative (Macherey Nagel, Düren, FRG) et ledit peptide est ensuite caractérisé.

L'homogénéité est confirmée par HPLC analytique sur une colonne Vydac C18 éluée avec un système de solvants (TFA-acétonitrile-eau), dans un appareil Shimadzu.

La pureté du peptide, supérieure à 96 % est déterminé par HPLC analytique en phase inverse.

L'identité de séquence du peptide purifié est confirmée par la détermination de la composition en acides aminés et par spectrométrie de masse enregistrée sur un spectromètre de masse (MALDI) (calculé 4258,9 [M+H]⁺, trouvé 4260,0).

La composition en acides aminés (à l'exception du tryptophane), contrôlée par hydrolyse acide totale (HAT) est présentée figure 2. On observe une sous-représentation de la valine (figure 2), qui se justifie par un enchaînement d'acides aminés aliphatiques difficilement hydrolysables comportant deux des trois valines (AVVI) du peptide natif HIV-POL.

b) Préparation des mixotopes :

Ceux-ci sont préparés comme décrits dans H. GRAS-MASSE et al., précité.

Brièvement, des quantités équimolaires d'acides aminés protégés
5 sont pesées et sont utilisées dans les réactions de couplage.

Pour compenser les différences de cinétique dans les réactivités des différents acides aminés, un premier couplage est réalisé avec 1 mmol (quantité totale) de Boc-acide-aminé (ou d'un mélange de Boc-acides-aminés). Un deuxième couplage, utilisant 2 mmol (quantité totale), est alors systématiquement réalisé. Après un clivage
10 à l'acide fluorhydrique, le peptide brut est dissous dans du TFA (30 ml) et précipité par ajout dudit peptide dans une solution de diéthyléther froid (300 ml).

Après centrifugation, le précipité est dissous dans l'eau et lyophilisé. Après oxydation à l'air de la solution à pH neutre, le mixotope est purifié par filtration sur gel sur une colonne TSK HW40S (Merck, Darmstadt, FRG). Un aliquot de chaque
15 mixotope purifié est soumis à une hydrolyse acide totale pendant 24 heures avec un mélange HCl 6N:phénol (10:1), pour la détermination de la composition en acides aminés.

Le remplacement des acides aminés de MIXO(HIV-POL) est précisé à la figure 1. Après purification en gel filtration (TSK HW 40S) un échantillon de la
20 fraction utilisée dans les tests ELISA est soumise à une HAT dont le résultat est présenté figure 3. On observe comme pour la HAT du peptide natif (HIV-POL) une sous représentation de la valine (V) mais également de l'isoleucine (I) à l'issue de la HAT du MIXO(HIV-POL). La valine étant remplacée par l'isoleucine dans le mixotope et faisant partie d'une séquence hautement hydrophobe du mixotope, et donc difficile-
25 ment hydrolysable, permet d'expliquer les quantités minorées de Val et Ile dans le résultat de cette HAT (figure 3).

c) Exemples de différents réactifs conformes à l'invention :

La séquence du peptide HIV-POL et des mixotopes qui en dérivent sont représentés à la figure 1.

Ces réactifs sont, de préférence, fixés sur support solide (microplaque) à une concentration de 0,1 µg/puits, pour le peptide HIV-POL et à une concentration de 10 µg/puits pour les mixotopes.

EXEMPLE 2 : Test immuno-enzymatique mettant en oeuvre un réactif selon l'invention pour la sérodétection du VIH1.

A. Matériel et méthodes :

- ELISA :

Des puits de plaques de microtitration (Nunc, Maxisorp, Rocksilde, Danemark) sont recouverts pendant une nuit à 4°C, soit avec 0,2 ml de peptide HIV-POL (SEQ ID NO:1), soit avec un mixotope (MIXO(HIV-POL)) (0,5 µg/ml dans 50 mM de NaHCO_3 , pH 9,6), soit séquentiellement avec 0,2 ml de peptide HIV-POL (0,5 µg/ml) et 0,2 ml de mixotope (MIXO(HIV-POL)) (50 µg/ml).

Chaque puits est ensuite lavé avec un tampon phosphate 0,01 M comprenant du NaCl 1,8 %, pH 7,4 (PBS) et les sites de liaison en excès sont bloqués par de l'albumine (addition de 0,3 ml de BSA 2 % (sérum albumine bovine) dans du PBS, à 37°C, pendant 60 minutes).

Après 3 lavages avec 0,3 ml de PBS 0,5 %-Tween 20 (Sigma) (tampon PBS-T), les sérums humains à tester sont dilués au 1/50 dans du PBS-T comprenant de la sérum albumine bovine (BSA) 2 % et sont incubés dans des puits contenant le réactif selon l'invention comme précisé ci-dessus, pendant 120 minutes à 37°C, dans une atmosphère humidifiée.

Après 4 lavages, les conjugués peroxydase-anticorps de chèvre-anti-IgG-A-M humaines (Diagnostic Pasteur), dilués au 1/10 000 dans du tampon PBS-T comprenant de la BSA 2 %, sont incubés pendant 60 minutes à 37°C.

L'anticorps conjugué, qui se lie aux Ig fixées sur le support, est révélé pour son activité peroxydase, en utilisant comme substrat du dihydrochlorure d'o-phénylènediamine et de l' H_2O_2 , dans un tampon citrate 0,05 M, pH 5,5, pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

La réaction est bloquée par l'addition d' H_2SO_4 4N (50 µl). L'absorbance est enregistrée contre un blanc à 492 nm (A_{492}), avec un lecteur automatique multicanaux (M_R 5000, Dynatech).

La moyenne $A_{492} + 3$ déviations standards (SD) des échantillons séronégatifs est utilisée comme valeur seuil dans les tests ELISA.

- Mesure de l'avidité de la liaison à l'anticorps :

La spécificité de liaison des sérums positifs aux différents mixotopes en phase solide est évaluée par l'absorption des anticorps par l'antigène HIV-POL natif en solution, en utilisant la méthode de B. FRIGUET et al. (J. Immunol. Methods, 1985, 77, 305-319).

Cette méthode est basée sur la mesure de la concentration en anticorps libre par une méthode ELISA indirecte, lorsque l'antigène HIV-POL et les anticorps sont à l'équilibre en solution.

L'antigène HIV-POL, à différentes concentrations (10^{-10} M à $2 \cdot 10^{-6}$ M) est d'abord incubé en solution (tampon PBS-T + BSA 2 %) avec un sérum séro-positif, à concentration constante (1/50) jusqu'à l'atteinte de l'état d'équilibre.

Après une incubation pendant 18 heures à 4°C, 200 µl de chaque mélange est transféré et incubé pendant 60 min à 20°C dans les puits d'une plaque de microtitration, préalablement recouverte de peptide HIV-POL (0,2 ml, correspondant à 0,5 µg/ml) ou d'un mixotope (MIXO(HIV-POL) (50 µg/ml, 0,2 ml), dans du NaHCO_3 , 50 mM, pH 9,6.

Après lavage avec du tampon PBS-T, les immunoglobulines liées sont détectées par addition d'anticorps de chèvre anti-IgG-A-M humaines, couplés à de la peroxydase.

L'anticorps conjugué, qui se lie aux Ig, est révélé par l'activité peroxydase comme décrit ci-dessus. Cette méthode donne les courbes de déplacement de la liaison A/A_0 par rapport à $\log(a_0)$. Une estimation précise de l'avidité moyenne du sérum contenant les anticorps anti-HIV-POL est donnée par l'équation $A_0/(A_0-A) = 1/v = 1 + Kd/a_0$, dans laquelle a_0 est la concentration en antigène soluble total, A et A_0 sont les absorbances à 492 nm avec ou sans antigène bloquant, respectivement et v est la fraction d'anticorps lié, si les différentes conditions exposées dans FRIGUET et al. sont satisfaites.

B. Résultats

a) Liaison anticorps sériques-HIV-POL (ELISA HIV-POL) :

La réactivité des Ig G humaines anti-HIV-POL vis-à-vis du peptide HIV-POL est analysée par un test ELISA, sur différents sérums : 20 sérums séro-positifs (confirmés en western blot) et 26 sérums séronégatifs.

65 % des sérums HIV1 séropositifs (13 sérums sur 20) dilués au 1/50 sont détectés avec l'antigène HIV-POL utilisé à une concentration de " coating " de 0,1 µg/puits (figure 4A). Une concentration supérieure (1 µg/puits) entraîne l'apparition d'un serum faux-positifs faisant chuter la spécificité de 100 % à 95 % (figure 4B).

b) Liaison anticorps sériques mixotopes (ELISA mixotope) :

Les mixotopes ont été testés comme antigènes en phase solide, à deux concentrations , à savoir 0,1 µg et 10 µg/puits (figure 5).

L'utilisation de MIXO(HIV-POL) seul dans les tests ELISA (figures 5A et 5B) n'est pas satisfaisante puisque la sensibilité de la détection des IgG ne dépasse pas 50 % à la meilleure concentration de coating (figure 5B).

En revanche, on constate avec le mixotope MIXO(HIV-POL), une diminution du signal produit par les sérums de patients HIV1 séronégatifs. Cette propriété du mixotope est mise à profit dans le test de combinaison des peptides.

c) Liaison anticorps sériques-réactif selon l'invention (combinaisons peptide HIV-POL+ mixotope) (ELISA HIV-POL + mixotope) :

Si un " coating " séquentiel des plaques ELISA est réalisé avec le peptide natif à une concentration de 1 µg/puits entraînant une diminution de la spécificité (figure 4B) puis avec son mixotope MIXO(HIV-POL) à sa concentration la plus efficace (10 µg/puits), on observe (figure 6) que cette combinaison ne laisse apparaître aucun serum faux-positif et, surtout, permet de passer de 65 % (peptide natif seul) à 80 % de détection des sérums HIV1 positifs. La combinaison de HIV-POL avec son mixotope, MIXO(HIV-POL), a permis d'augmenter la sensibilité de la sérodétection de 15 % tout en présentant une spécificité de 100 %.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui

viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1°) Réactif de détection d'une infection provoquée par un virus de l'immunodéficience humaine, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange constitué par (1) un peptide antigénique codé par le gène *pol* du VIH1 comprenant au plus 60 acides aminés, de préférence entre 20 et 40 acides aminés et (2) un mélange, dénommé mixotope, de peptides combinatoires convergents, dérivés dudit peptide antigénique.

2°) Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit peptide antigénique correspond à un épitope de l'intégrase codée par le gène *pol* du VIH1.

3°) Réactif selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit peptide antigénique correspond à la séquence KIQNFRVYYRDSRDPLWKGPALL WKGE GAVVIQDN (SEQ ID NO:1) (HIV-POL).

4°) Réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le mixotope correspond à une dégénération de l'ensemble du peptide antigénique sélectionné.

5°) Réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le peptide antigénique (1) et le mixotope (2) sont fixés sur un support solide, de préférence des plaques de microtitration.

6°) Réactif selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit peptide antigénique (1) et ledit mixotope (2) sont fixés séquentiellement sur ledit support.

7°) Réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le rapport peptide antigénique:mixotope dans le mélange est compris entre 1:10 et 1:100.

8°) Procédé de diagnostic d'une infection à VIH1, par une méthode immuno-enzymatique, caractérisé en ce qu'il met en œuvre un réactif de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact d'un sérum à analyser avec un réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7,

- l'addition d'anticorps anti-Ig humaines, couplés à une enzyme et
- la révélation qualitative et/ou quantitative des anticorps anti-intégrase, éventuellement présents dans le sérum à analyser par addition du substrat de l'enzyme.

5 10°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la fixation d'un réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 sur un support, tel qu'une plaque de microtitration,
- l'addition du sérum à analyser et
- 10 - la détection de la fixation des anticorps anti-intégrase présents dans ledit sérum par addition d'anticorps anti-IgG humaines, couplés à une enzyme et
- la révélation qualitative et/ou quantitative au spectrophotomètre par addition du substrat de l'enzyme.

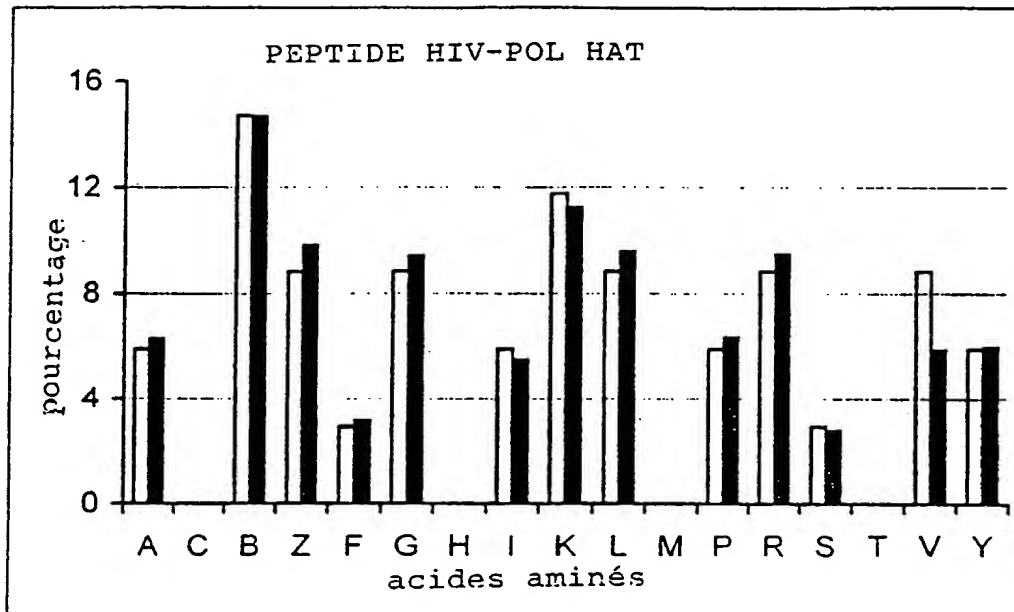
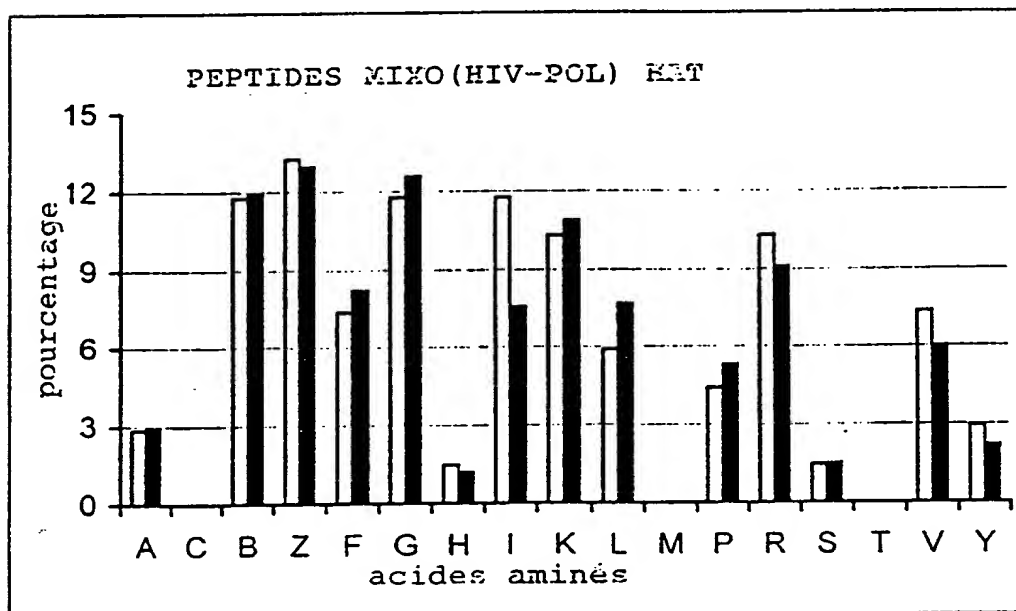
15 11°) Kit ou coffret de diagnostic d'une infection virale à VIH1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

HIV-POL	K	I	Q	N	F	R	V	Y	Y	R	D	S	R	D	P	L	W	K	G	P	A	K	L	L	W	K	G	E	G	A	V	V	I	Q	D	N
MIXO(HIV-POL)	K	I	Q	N	F	R	V	Y	Y	R	D	S	R	D	P	L	W	K	G	P	A	K	L	L	W	K	G	E	G	A	V	V	I	Q	D	N
	R	V	N	Q	L	K	I	F	F	K	E	H	K	E	Q	I	F	R	G	R	I	I	F	R	D	G	I	I	V	N	E	Q				

FIGURE 1



2/5

FIGURE 2FIGURE 3



3 / 5

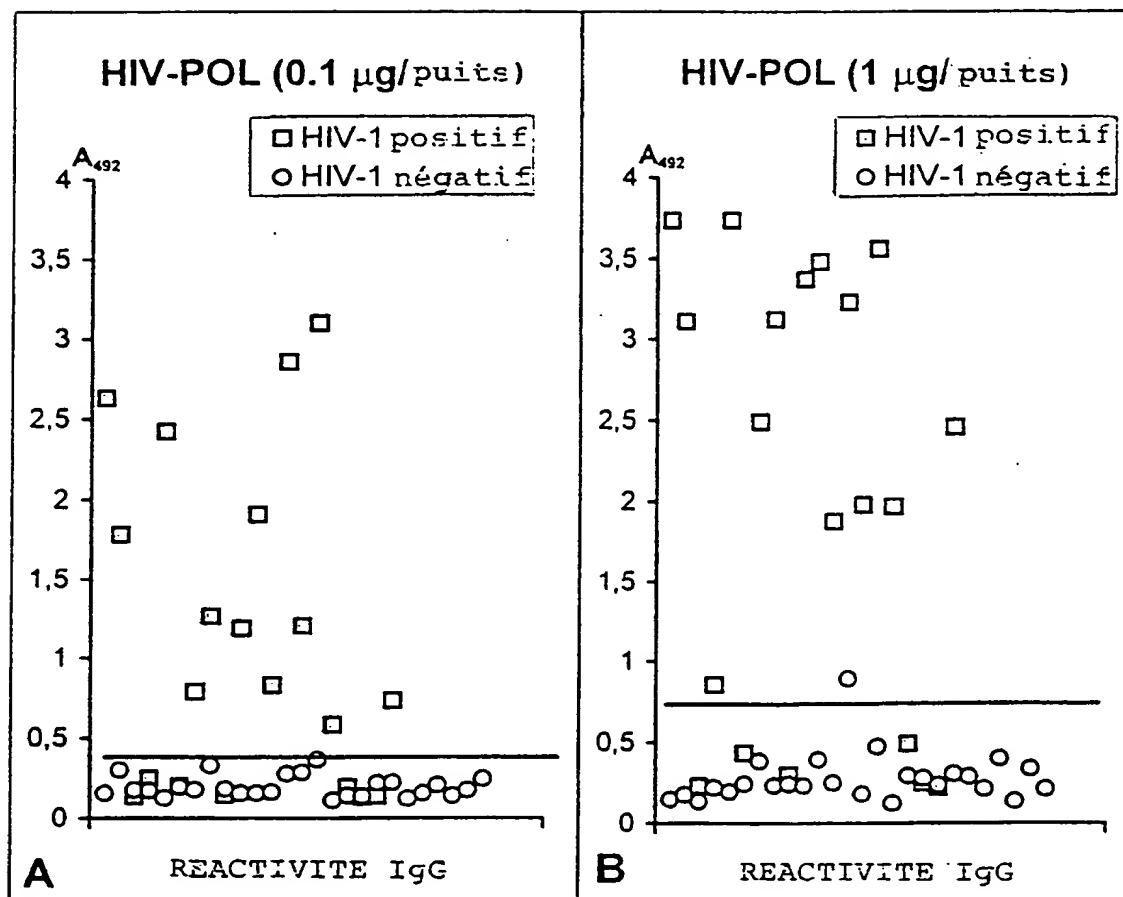


FIGURE 4



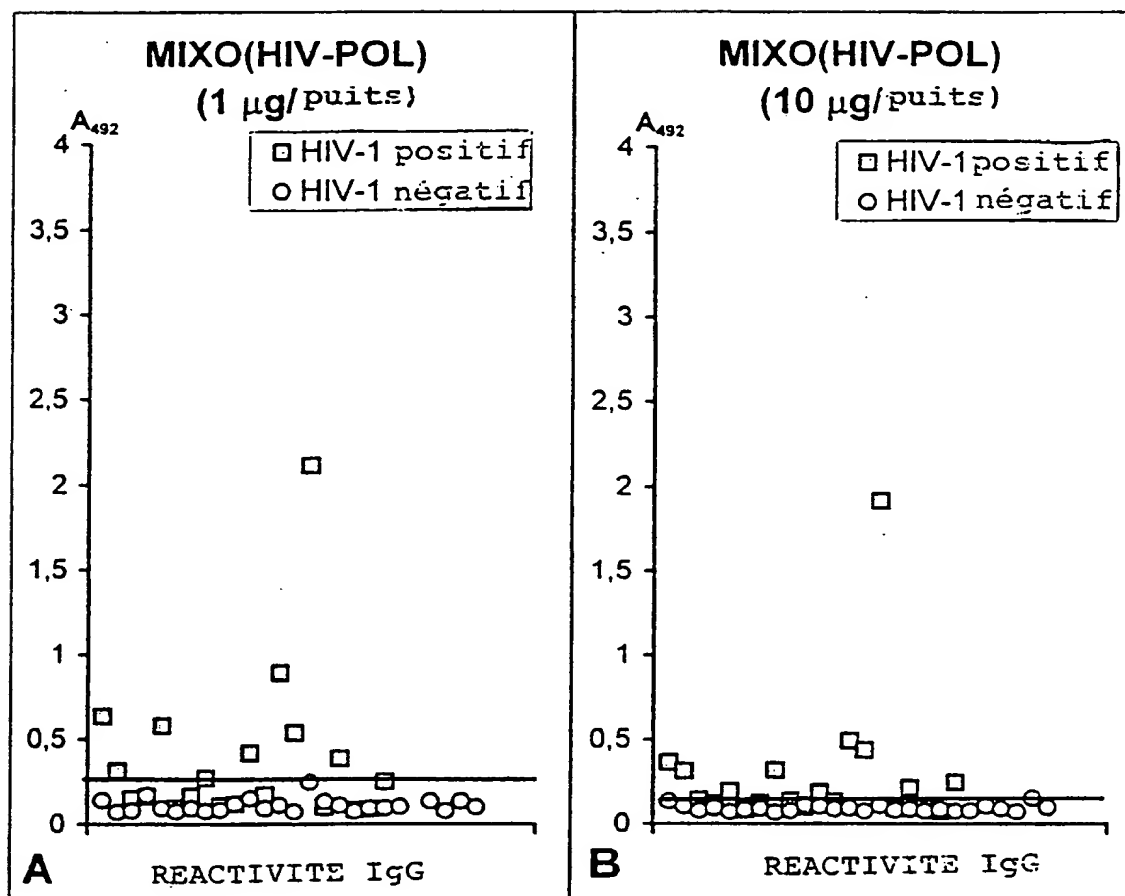


FIGURE 5



5/5

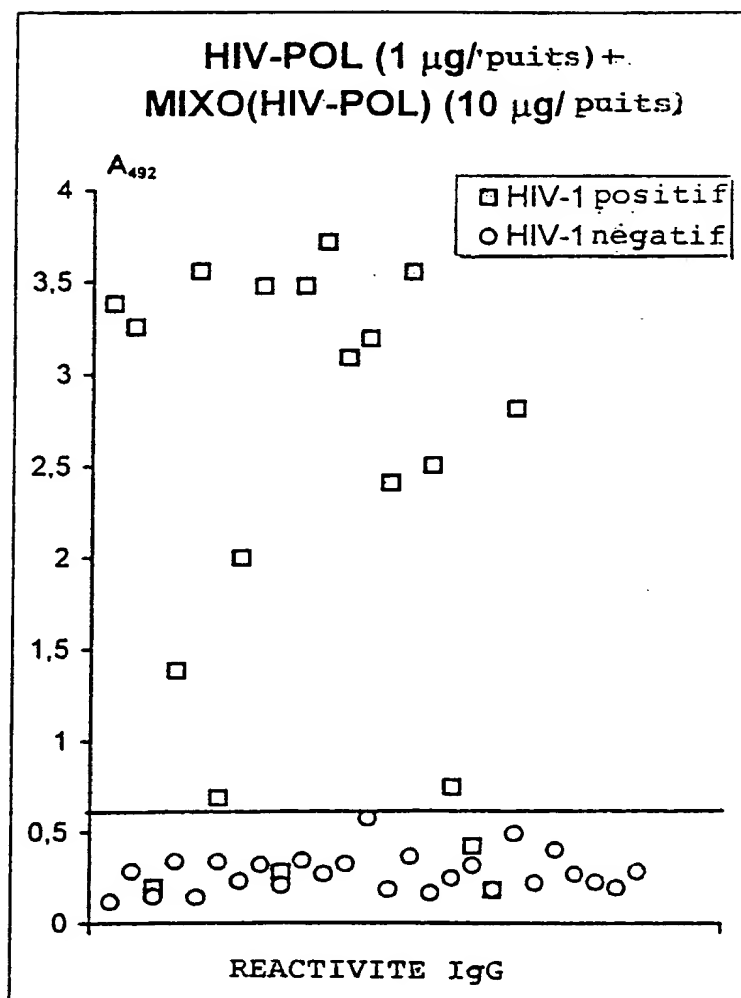


FIGURE 6

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT PASTEUR DE LILLE
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS
TRANCHAND-BUNEL, Denis
AURIAULT, Claude
GRAS-MASSE, Hélène

<120> REACTIF DE DETECTION ET DE SUIVI DES INFECTIONS VIRALES
A VIH ET SES APPLICATIONS.

<130> BLOcp226/75PCT

<140>
<141>

<150> 98 16727
<151> 1998-12-31

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 36
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus

<400> 1
Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro Leu
1 5 10 15
Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Val
20 25 30
Ile Gln Asp Asn
35



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/03311

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAAS, GABY; SAMRI, ASSIA; GOMARD, ELISABETH; HOSMALIN, ANNE; DUNTZE, JOERG; BOULEY, JEAN-MARC; IHLENFELDT, HANS-GEORG; KATLAMA "Cytotoxic T-cell responses to HIV-1 reverse transcriptase, integrase and protease" AIDS (LONDON), vol. 12, no. 12, 1998, pages 1427-1436, XP002117622 the whole document — —/—	1,2,4, 7-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 March 2000

Date of mailing of the international search report

05/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 6818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/03311

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HASHIDA, SEIICHI; HASHINAKA, KAZUYA; ISHIKAWA, SETSUKO; ISHIKAWA, EIJI: "More reliable diagnosis of infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by detection of antibody IgGs to pol and gag proteins of HIV-1 and p24 antigen of HIV-1 in urine, saliva, and/or serum with highly sensitive and specific enzyme immunoassay (immune complex ..." JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS, vol. 11, no. 5, 1997, pages 267-286, XP002117623 the whole document	1,4,7-11
Y	DATABASE WPI 'Online! DERWENT PUBLICATIONS LTD., LONDON, GB Class C12N15/48, AN 1998-167215, 27 July 1997 (1997-07-27) ALATORTSEVA G I; GOLTISOV V A; SUKHANOVA L L: "New hybrid polypeptide 1106 - used for determination of antibodies to HIV-1, useful in diagnosis of AIDS" XP002117628 abstract	1,2,4, 7-11
Y	& RU 2 085 586 A (BIOTEKHNOLOGICHESKAYA KOMPANIY (RU)) column 4, line 48, paragraph 6 - line 52	1,2,4, 7-11
Y	GRAS-MASSE H, AMEISEN JC, BOUTILLON C, ROUAIX F, BOSSUS M, DEPREZ B, NEYRINCK JL, CAPRON A, TARTAR A: "Synthetic vaccines and HIV-1 hypervariability: a "mixotope" approach" PEPTIDE RESEARCH, vol. 5, no. 4, July 1992 (1992-07) - August 1992 (1992-08), pages 211-216, XP002117624 cited in the application the whole document	1,2,4, 7-11
Y	R VOLKMER-ENGERT, B EHRHARD, J HELLWIG, A KRAMER, W HOEHNE, J SCHNEIDER-MERGENER: "Preparation, analysis and antibody binding studies of simultaneously synthesized soluble and cellulose-bound HIV-1 p24 peptide epitope libraries" LETTERS IN PEPTIDE SCIENCE, vol. 1, no. 5, 1995, pages 243-253, XP002117625 the whole document	1,2,4, 7-11

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/FR 99/03311

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VINGA-MARTINS C; SCHNEIDER T; WERNO A; ROENSPECK W; PAULI G; MUELLER-LANTZSCH N: "Mapping of immunodominant epitopes of the HIV-1 and HIV-2 integrase proteins by recombinant proteins and synthetic peptides" AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 8, no. 7, July 1992 (1992-07), pages 1301-1310, XP002117626 the whole document	
A	GEYSEN HM, MASON TJ, RODDA SJ: "Cognitive features of continuous antigenic determinants" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, vol. 1, no. 1, February 1998 (1998-02), pages 32-41, XP002117627 cited in the application the whole document	1
A	DE 197 27 943 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 September 1998 (1998-09-24) claim 1	1,2
A	WO 90 10230 A (UNIV OTTAWA) 7 September 1990 (1990-09-07) claims 1,2	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/03311

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
RU 2085586	A	27-07-1997	NONE	
DE 19727943	A	24-09-1998	AU 6727798 A	29-09-1998
			WO 9840744 A	17-09-1998
			EP 0972198 A	19-01-2000
WO 9010230	A	07-09-1990	CA 1330425 A	28-06-1994
			AU 5184190 A	26-09-1990
			AU 5187190 A	26-09-1990
			WO 9010078 A	07-09-1990
			US 5858646 A	12-01-1999
			CA 2050302 C	18-03-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Don. Internationale No
PCOR 99/03311

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/569

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	HAAS, GABY; SAMRI, ASSIA; GOMARD, ELISABETH; HOSMALIN, ANNE; DUNTZE, JOERG; BOULEY, JEAN-MARC; IHLENFELDT, HANS-GEORG; KATLAMA "Cytotoxic T-cell responses to HIV-1 reverse transcriptase, integrase and protease" AIDS (LONDON), vol. 12, no. 12, 1998, pages 1427-1436, XP002117622 le document en entier — —/—	1,2,4, 7-11

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/04/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hart-Davis, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 99/03311

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>HASHIDA, SEIICHI; HASHINAKA, KAZUYA; ISHIKAWA, SETSUKO; ISHIKAWA, EIJI: "More reliable diagnosis of infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by detection of antibody IgGs to pol and gag proteins of HIV-1 and p24 antigen of HIV-1 in urine, saliva, and/or serum with highly sensitive and specific enzyme immunoassay (immune complex ..."</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS, vol. 11, no. 5, 1997, pages 267-286, XP002117623</p> <p>le document en entier</p>	1,4,7-11
Y	<p>DATABASE WPI 'Online!</p> <p>DERWENT PUBLICATIONS LTD., LONDON, GB</p> <p>Class C12N15/48, AN 1998-167215, 27 juillet 1997 (1997-07-27)</p> <p>ALATORTSEVA G I; GOLTSOV V A; SUKHANOVA L L: "New hybrid polypeptide 1106 - used for determination of antibodies to HIV-1, useful in diagnosis of AIDS"</p> <p>XP002117628</p> <p>abrégé</p>	1,2,4,7-11
Y	<p>& RU 2 085 586 A (BIOTEKHNOLOGICHESKAYA KOMPANIY (RU))</p> <p>colonne 4, ligne 48, alinéa 6 - ligne 52</p>	1,2,4,7-11
Y	<p>GRAS-MASSE H, AMEISEN JC, BOUTILLON C, ROUAIX F, BOSSUS M, DEPREZ B, NEYRINCK JL, CAPRON A, TARTAR A: "Synthetic vaccines and HIV-1 hypervariability: a "mixotope" approach"</p> <p>PEPTIDE RESEARCH, vol. 5, no. 4, juillet 1992 (1992-07) - août 1992 (1992-08), pages 211-216, XP002117624</p> <p>cité dans la demande</p> <p>le document en entier</p>	1,2,4,7-11
Y	<p>R VOLKMER-ENGERT, B EHRHARD, J HELLWIG, A KRAMER, W HOEHNE, J SCHNEIDER-MERGENER: "Preparation, analysis and antibody binding studies of simultaneously synthesized soluble and cellulose-bound HIV-1 p24 peptide epitope libraries"</p> <p>LETTERS IN PEPTIDE SCIENCE, vol. 1, no. 5, 1995, pages 243-253, XP002117625</p> <p>le document en entier</p>	1,2,4,7-11

-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Internationale No

PCT/FR 99/03311

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	VINGA-MARTINS C; SCHNEIDER T; WERNO A; ROENSPECK W; PAULI G; MUELLER-LANTZSCH N: "Mapping of immunodominant epitopes of the HIV-1 and HIV-2 integrase proteins by recombinant proteins and synthetic peptides" AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 8, no. 7, juillet 1992 (1992-07), pages 1301-1310, XP002117626 le document en entier	
A	GEYSEN HM, MASON TJ, RODDA SJ: "Cognitive features of continuous antigenic determinants" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, vol. 1, no. 1, février 1998 (1998-02), pages 32-41, XP002117627 cité dans la demande le document en entier	1
A	DE 197 27 943 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 septembre 1998 (1998-09-24) revendication 1	1,2
A	WO 90 10230 A (UNIV OTTAWA) 7 septembre 1990 (1990-09-07) revendications 1,2	1,2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Organisation Internationale No

PCT/FR 99/03311

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
RU 2085586 A	27-07-1997	AUCUN	
DE 19727943 A	24-09-1998	AU 6727798 A	29-09-1998
		WO 9840744 A	17-09-1998
		EP 0972198 A	19-01-2000
WO 9010230 A	07-09-1990	CA 1330425 A	28-06-1994
		AU 5184190 A	26-09-1990
		AU 5187190 A	26-09-1990
		WO 9010078 A	07-09-1990
		US 5858646 A	12-01-1999
		CA 2050302 C	18-03-1997